

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Genová exprese cytochromů P450 1A1 a 1A2 v závislosti
na kombinaci aplikace induktorů Sudanu I a
benzo[a]pyrenu**

*Role of combined application of inducers Sudan I and benzo[a]pyrene in
cytochrome P450 1A1 and 1A2 gene expression*

Bakalářská práce

Zdeněk Gajdík

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za cenné rady, ochotu, trpělivost, připomínky a především za všechnu čas, který mi věnovala během celé práce.

Abstrakt

Benzo[*a*]pyren je jedním z nejvýznamnějších lidských karcinogenů vyskytujících se prakticky ve všech složkách životního prostředí. Vzniká při spalovacích procesech a je také součástí cigaretového kouře. Sudan I je azobarvivem, dříve používaným i k barvení potravin, schopným vyvolat tvorbu nádorů u laboratorních zvířat. Přeměna obou látek cytochromy P450 1A vede k aktivaci těchto látek ve směru tvorby aduktů s DNA.

Cílem této bakalářské práce je studium vlivu vystavení laboratorních potkanů benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I, podávaných samostatně nebo společně, na genovou expresi cytochromů P450 1A1 a 1A2 v játrech, ledvinách a plicích. Metodou kvantitativní PCR bylo zjištěno, že dochází k významnému zvýšení genové exprese obou enzymů ve všech zkoumaných orgánech. K nejvýraznějšímu zvýšení hladiny mRNA dochází u CYP1A1 v játrech všech premedikovaných potkanů. V případě kombinovaného podání obou látek při aplikaci benzo[*a*]pyrenu před Sudanem I byl v porovnání s jejich samostatným podáním pozorován aditivní nárůst indukce genové exprese CYP1A1 v játrech a ledvinách a genové exprese CYP1A2 v plicích. Zvýšená exprese CYP1A1 způsobená indukčním působením obou studovaných sloučenin může významně ovlivňovat jejich vlastní metabolismus a tím zvyšovat jejich karcinogenní potenciál.

Klíčová slova: benzo[*a*]pyren, Sudan I, cytochrom P450, mRNA, kvantitativní PCR

Abstract

The ubiquitous environmental pollutant benzo[*a*]pyrene is a human carcinogen that is formed during combustion processes and is also a part of cigarette smoke. The widely employed azo-dye Sudan I, a substance previously used as an orange food colouring, causes tumours in laboratory animals. Both compounds require metabolic activation to exert their genotoxic effect. One of the enzyme participating on their oxidation is cytochrome P450 1A.

The aim of the Bachelor thesis was to compare the effect of application of benzo[*a*]pyrene and Sudan I administered individually or in combination to Wistar rats on gene expression of cytochrome P450 1A1 and 1A2 in livers, kidneys and lungs. Having used the real-time PCR method, we found a significant increase in gene expression of both enzymes in all examined organs. The highest induction of gene expression was observed for CYP1A1 in livers of rats of all treatment groups. The application of benzo[*a*]pyrene before Sudan I additionally enhanced mRNA levels of hepatic and renal CYP1A1 and pulmonary CYP1A2 in comparison to those of the rats treated only with BaP or Sudan I alone. The induction potential of both compounds on increased expression of CYP1A1 might mutually influence their own biotransformation and, therefore, increase their carcinogenic potential.

(In Czech)

Key words: benzo[*a*]pyrene, Sudan I, cytochrome P450, mRNA, real-time PCR

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1. XENOBIOTIKA	10
1.1.1. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	10
1.2. CYTOCHROMY P450	12
1.2.1. NOMENKLATURA CYTOCHROMŮ P450	13
1.2.2. STRUKTURA CYTOCHROMU P450	13
1.2.3. CYTOCHROMY P450 1A1 A 1A2	14
1.3. RECEPTOR PRO AROMATICKÉ UHLOVODÍKY.....	16
1.3.1. STRUKTURA AH RECEPTORU	16
1.3.2. SIGNÁLNÍ DRÁHA AHR.....	17
1.4. POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY (PAH)	19
1.4.1. BENZO[A]PYREN	19
1.4.1.1. METABOLISMUS BENZO[A]PYRENU	20
1.5. AZOBARVIVA	22
1.5.1. SUDAN I	22
1.5.1.1. METABOLISMUS SUDANU I	23
2. CÍL PRÁCE	25
3. MATERIÁL A METODY	26
3.1. POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	26
3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE	26
3.3. POUŽITÉ METODY.....	27
3.3.1. PREMEDIKACE POTKANŮ.....	27
3.3.2. IZOLACE RNA.....	28
3.3.3. HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA RNA NA AGAROSOVÉM GELU	29
3.3.4. STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY RNA	30
3.3.5. REVERZNÍ TRANSKRIPCE – SYNTÉZA CDNA	31
3.3.6. REAL-TIME (KVANTITATIVNÍ) PCR.....	32

3.3.7. ANALÝZA DAT KVANTITATIVNÍ PCR (RELATIVNÍ KVATIFIKACE)	34
3.3.1. HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA VZORKŮ DNA NA AGAROSOVÉM GELU...	35
4. VÝSLEDKY	36
4.1. IZOLACE CELKOVÉ RNA	36
4.2. RELATIVNÍ KVANTIFIKACE MRNA PRO CYP1A1 A CYP1A2.....	38
4.3. ELEKTROFORÉZA SYNTETIZOVANÝCH ÚSEKŮ DNA.....	43
5. DISKUZE	44
6. ZÁVĚR.....	47
SEZNAM LITERATURY	48

Seznam použitých zkratk

AhR	receptor aromatických uhlovodíků
AKRs	„aldo-keto reductase“ – aldo-keto reduktasa
ARNT	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků
A	absorbance
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
bHLH	bazický „helix-loop-helix“ protein
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP, P450	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
DRE/XRE	sekvence „dioxin/xenobiotic response element“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HSP90	protein teplotního šoku o molekulové hmotnosti 90 kDa
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NLS	„nuclear localization signal“ – jaderný lokalizační signál
NES	„nuclear export signal“ – jaderní exportní signál
PAS	doména „Per-Sim-Arnt“
PCR	polymerasová řetězová reakce
SI	Sudan I
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XAP2	„X-associated protein“ – X-asociovaný protein

1. Úvod

Jednou z nejzávažnějších civilizačních chorob jsou nádorová onemocnění, která postihují stále nižší věkové ročníky a jejich léčba je značně komplikovaná. Proces vzniku nádorových onemocnění se nazývá karcinogeneze a lze jej charakterizovat nekontrolovatelným množením abnormálních buněk. Jednou z příčin vzniku nádorových onemocnění je vystavení lidského organismu cizorodým látkám (xenobiotikům) [1]. Jedná se o látky produkované především důsledkem lidské činnosti, které jsou pro organismus potenciálně toxické a může docházet k jejich akumulaci v přírodě, což vede ke změnám v ekosystému. Osud těchto látek v organismu závisí na jejich biotransformaci [2]. Mezi jedny z nejvýznamnějších biotransformačních enzymů patří cytochromy P450, které jsou součástí systému monooxygenas se smíšenou funkcí [1].

Mezi nejzávažnější xenobiotika patří chemické kancerogeny. Tyto kancerogeny nebo jejich metabolity mohou v buňkách reagovat s DNA a vazbou na báze nebo deoxyribosu tvořit s DNA kovalentní adukty. Dalšími méně častými modifikacemi jsou apurinace, apyrimidinace DNA, vznik cyklických aduktů, tvorba hydroxyderivátů bází a pyrimidinových dimerů [1].

Studované látky benzo[a]pyren a Sudan I patří mezi chemické karcinogeny. Benzo[a]pyren je nejčastěji produkován při spalovacích procesech a je také součástí cigaretového kouře [3]. Sudan I byl dříve používán jako oranžové potravinářské barvivo. Jedná se o silný alergen a potenciální karcinogen pro člověka [4].

1.1. Xenobiotika

Xenobiotika jsou látky cizího původu, které se za normálních podmínek v organismu nevyskytují. Nejsou tedy nutné pro zdravý vývoj organismu ani jako zdroj energie [5]. Pojem xenobiotika zahrnuje jak látky průmyslové výroby tak i přírodní povahy, jako jsou léčiva, průmyslové chemikálie, pesticidy, alkaloidy, sekundární metabolity rostlin a toxiny produkované plísněmi, rostlinami a živočichy [6]. Tyto látky se do organismu dostávají třemi hlavními cestami: trávicím ústrojím, plícemi a pokožkou [5]. Způsob vstupu xenobiotik závisí na zdroji, ve kterém se vyskytují, a na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, zejména na rozpustnosti ve vodě, těkavosti, reaktivitě a lipofilitě. Lipofilní látky prochází snadněji přes epitelovou tkáň, kterou tvoří velké množství lipidů, a mohou být snadno reabsorbovány. Odstranění těchto látek z organismu probíhá procesem známým jako biotransformace, který je katalyzován enzymy v játrech, plicích, ledvinách, střevech, kůži a dalších tkáních [5,6].

1.1.1. Biotransformace xenobiotik

Biotransformace xenobiotik je hlavním mechanismem pro udržení homeostázy během vystavení organismu cizorodým látkám. Biotransformací dochází k přeměně xenobiotik na hydrofilnější sloučeniny, které jsou snadněji vylučovány z organismu. Vedle vylučování těchto látek z organismu může docházet i k jejich aktivaci, která vede k přeměně na sloučeniny více toxické. Biotransformaci zajišťují enzymy, které metabolizují i velké množství endogenních látek, jako jsou steroidní hormony, vitamin A a D, bilirubin a mastné kyseliny [6]. Biotransformace zahrnuje dva základní procesy, a to I. a II. fázi biotransformace, během kterých dochází k přeměně lipofilních xenobiotik na látky polární [7].

I. fáze biotransformace, nebo-li derivatizační fáze, vede ke zvýšení polarity xenobiotika pomocí následujících chemických pochodů: oxidace, hydroxylace, deaminace, epoxidace, sulfoxidace, N-hydroxylace, redukce a hydrolytické reakce. Molekuly s vyšší polaritou mohou vstupovat do II. fáze biotransformace, při které dochází ke konjugaci s endogenními látkami. Výsledkem těchto reakcí je vytvoření produktů, které jsou mnohem lépe rozpustné ve vodě a mohou být vyloučeny z organismu, a tak nedochází k jejich akumulaci v těle [1,5].

V I. fázi biotransformace hraje významnou roli systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO). Je tvořen třemi základními složkami: hemthiolátovým enzymem cytochromem P450, flavoproteinovým enzymem NADPH:cytochrom P450 reduktasou a membránovými lipidy. Tento systém enzymů, využívající pro jím katalyzované reakce molekulární kyslík, katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí [1].

1.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou evolučně výrazně starší než jiné hemoproteiny. Jsou si do značné míry strukturně velmi podobné a od ostatních hemoproteinů se svou strukturou odlišují [8]. Vyskytují se prakticky ve všech organismech, ať už jsou to bakterie, kvasinky, houby, rostliny, živočichové a lidé [9]. V lidském těle se cytochromy P450 vyskytují převážně v játrech, dále také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách jsou cytochromy P450 lokalizovány v membránách hladkého endoplazmatického retikula a některé i v membránách mitochondrií [5].

Cytochromy P450 jsou součástí systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) a jsou terminální oxidasou tohoto systému [8]. Podílí se převážně na I. fázi biotransformace xenobiotik, kde katalyzují převážně oxidační, peroxidační ale i redukční reakce. Cytochromy P450 také katalyzují přeměnu mnoha endogenních sloučenin a uplatňují se též v biosyntéze mastných kyselin, kyseliny skořicové a dále pak fyziologicky významných sloučenin, jako jsou např. steroidní hormony, vitaminy D a prostaglandiny [5].

Na základě detoxikace xenobiotik lze cytochromy P450 rozdělit do čtyř základních skupin indukovaných rozdílnými skupinami látek. V první skupině je syntéza CYP450 indukována polyaromatickými uhlovodíky pomocí Ah receptoru, druhá skupina je indukována fenobarbitalovými látkami. Třetí skupina CYP450 je indukována glukokortikoidem deoxamethasomem a peroxisomové proliferátory zvyšují tvorbu CYP450 čtvrté skupiny [5].

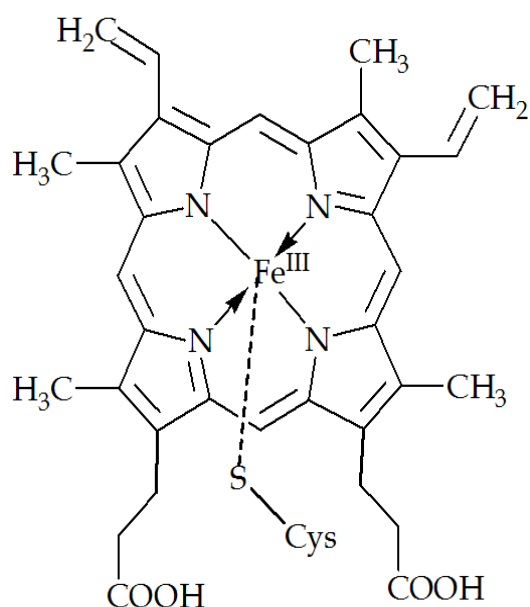
Název cytochrom P450 vychází ze skutečnosti, že redukovaný cytochrom P450 v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Písmeno P ve zkratce P450 znamená pigment [10,11].

1.2.1. Nomenklatura cytochromů P450

Systém názvosloví cytochromů P450 byl položen již v roce 1987 na základě evolučních vztahů mezi cytochromy. S přibývajícím množstvím objevených cytochromů se ale původní systém musel postupně změnit. Cytochromy P450, označované zkratkou CYP, se člení podle stupně homologie jejich primární struktury do rodin a podrodin. Rodiny se značí arabskou číslicí za zkratkou CYP. Pro zařazení do určité rodiny musí cytochromy vykazovat alespoň 40% podobnost v sekvenci aminokyselin. Za číslem rodiny se vyskytuje velké písmeno, které označuje zařazení do podrodiny. Do jedné podrodiny se řadí cytochromy, které vykazují 60% homologii své primární struktury. Arabská číslice za písmenem označujícím podrodinu určuje individuální izoformu cytochromu P450. Např. CYP1A2 je druhým členem v podrodině A patřící do první rodiny [12].

1.2.2. Struktura cytochromu P450

Cytochrom P450 je hemthiolátový protein obsahující ve své struktuře hem b (protoporfyrin IX). Centrální atom železa je v něm vázán čtyřmi dusíky



porfyrinového kruhu. Tento kruh je na proteinovou část cytochromu P450 vázán hydrofóbními vazbami a zároveň přes thiolátovou síru sulfhydrilové skupiny cysteinu přítomného v aktivním centru cytochromu. Thiolátová síra je tedy pátým ligandem iontu železa. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody. Tato struktura (obr. 1) umožňuje cytochromům P450 výjimečné chování odlišující je od ostatních hemoproteinů [2,5].

Obr. 1: Struktura hemu [13].

1.2.3. Cytochromy P450 1A1 a 1A2

Důležitou roli v přeměně xenobiotik hrají cytochromy P450 rodiny CYP1. K nejvýznamnějším enzymům podílejícím se na aktivaci prokarcinogenů pak patří cytochromy P450 podrodiny 1A. Pro lidské cytochromy P450 1A jsou známy 2 izoformy: CYP1A1 a CYP1A2 [14]. Tyto cytochromy jsou důležité pro biotransformaci xenobiotik, a to zejména polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických a aromatických aminů a amidů. I. fáze biotransformace těchto látek zprostředkovaná CYP1A vede u mnoha z nich k aktivaci jejich mutagenních a karcinogenních vlastností. Příkladem prokarcinogenu aktivovaného CYP1A je benzo[*a*]pyren [15].

Výzkumy rentgenové struktury ukázaly, že jaterní CYP1A2 má ze 72 % identickou aminokyselinovou sekvenci jako CYP1A1 [16]. Tyto dva enzymy jsou si tedy velmi podobné a katalyzují i podobné reakce. Liší se tedy převážně ve své lokalizaci. Zatímco CYP1A1 se nachází především v extrahepatálních tkáních, CYP1A2 je typickým jaterním enzymem [8].

Lidský cytochrom P450 1A1 je obsažen převážně v extrahepatálních tkáních, jako jsou kůže, gastrointestinální trakt, plíce, ledviny a hrtan, dále v placentě, plodu a embryu [16]. Exprese CYP1A1 byla nicméně prokázána na proteinové úrovni i v játrech [17]. CYP1A1 je neaktivnější enzym mezi cytochromy v přeměně prokarcinogenů do vysoce reaktivních forem meziproduktů. Tyto látky se dále mohou vázat na DNA a tvořit s ní adukty, což přispívá k mutagenезi a tvorbě nádorů [18]. CYP1A1 je indukován polycyklickými aromatickými uhlovodíky obsaženými v cigaretovém kouři. U kuřáků tak byla zjištěna zvýšená koncentrace CYP1A1 v plicích [8].

CYP1A2 je narozdíl od CYP1A1 typický svým výskytem v játrech. Lidský CYP1A2 je indukován nejenom v játrech, ale také v gastrointestinálním traktu, nosním epitelu a plicích, ledvinách, mozku, prostatě a kůži. Tento enzym hraje

významnou roli v metabolismu kofeinu a mnoha běžných léčiv, jako je melatonin, lidokain, olanzapin, takrin, teofylin, triamteren a zolmitriptan [19]. Účastní se biotransformace aromatických aminů, což jsou pyrolytické produkty tepelné úpravy potravin obsahujících bílkoviny, především masa. Pravidelnou konzumací těchto potravin následně dochází ke zvýšení jejich koncentrace v organismu. To může vést ke zvýšenému riziku vzniku nádorů [8].

Cytochromy P450 podrodiny 1A jsou inducibilní enzymy a obsah těchto enzymů v jednotlivých tkáních se tedy může výrazně lišit. V důsledku působení určitého xenobiotika může dojít k obohacení jednotlivých tkání cytochromy, které se zde za normálních podmínek vyskytují ve velmi nízkých koncentracích [10]. Pro tuto podrodinu je hlavním zprostředkovatelem indukce Ah receptor (aryl hydrocarbon receptor) [20].

1.3. Receptor pro aromatické uhlovodíky

Jedná se o cytosolový receptor pro látky s nízkou molekulovou hmotností, především pro planární aromatické uhlovodíky. V cytosolu se nachází v latentním stavu, kde je součástí multiproteinového komplexu. K expresi tohoto enzymu dochází ve většině buněk a orgánech, jakými jsou játra, plíce, kůže a gastrointestinální trakt [21]. Jeho hlavní funkce spočívá v kontrole exprese genů kódujících enzymy první fáze biotransformace xenobiotik. Ligandy tohoto receptoru jsou nejčastěji halogenové a polycyklické aromatické uhlovodíky, což má za následek zvýšení jejich toxických a karcinogenních účinků [22,23]. Navázání těchto ligandů na Ah receptor vede k transkripční aktivaci např. CYP1A1, 1A2 a 1B1 [24].

V jaterní tkáni myší byl tento receptor poprvé identifikován v roce 1976 specifickou vazbou na radioaktivně značený 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Jedná se o vysoce toxickou látku, znečišťující životní prostředí. Ligandy pro Ah receptor byly rozděleny do dvou základních kategorií: syntetické (důsledek lidské činnosti) a přírodní (látky běžně se vyskytující v přírodě) [25].

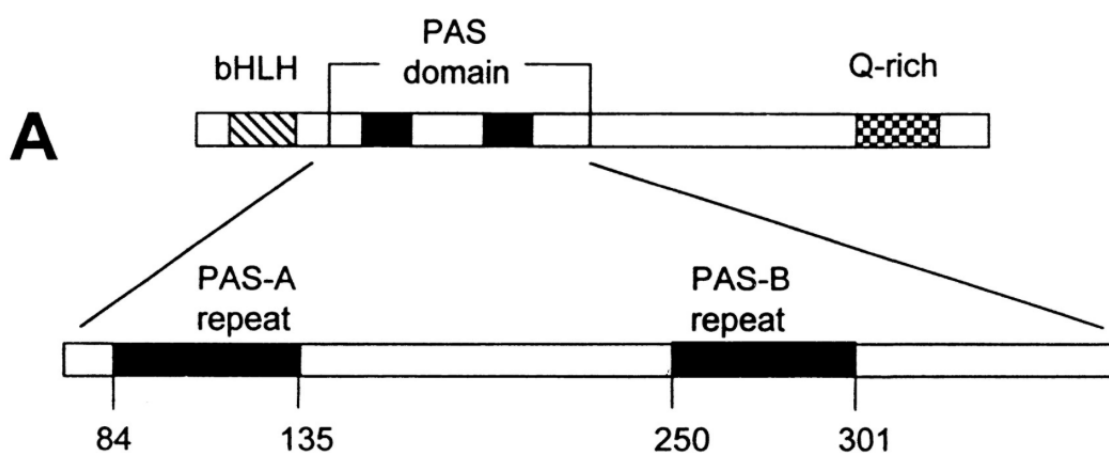
1.3.1. Struktura Ah receptoru

Ah receptor je členem bazických helix-loop-helix (bHLH) proteinů tvořících rodinu transkripčních regulátorů nacházejících se téměř ve všech eukaryotických organismech [26]. Samotný AhR protein je tvořen 3 základními doménami.

Na jeho N-konci se nachází doména bHLH odpovědná za vazbu na DNA a také za vazbu proteinu HSP90. Tato doména dále obsahuje sekvenci NLS (nuclear localization signal) a NES (nuclear export signal), které jsou zodpovědné za vstup aktivovaného Ah receptoru do jádra. Sekvence NES je obsažena i v doméně PAS [27,28,29].

PAS doména, pojmenovaná po proteinech Per-Sim-Arnt, se nachází na C-terminálním konci bHLH domény. Tato doména je složena z domény PAS A a PAS B, které se podílí na vazbě různých proteinů, HSP90 a ligandů AhR [26].

Poslední součástí Ah receptoru je doména bohatá na glutamin (Q-rich), důležitá z hlediska své aktivace transkripce některých cílových genů [30]. Schéma struktury Ah receptoru je znázorněno na obrázku 2.

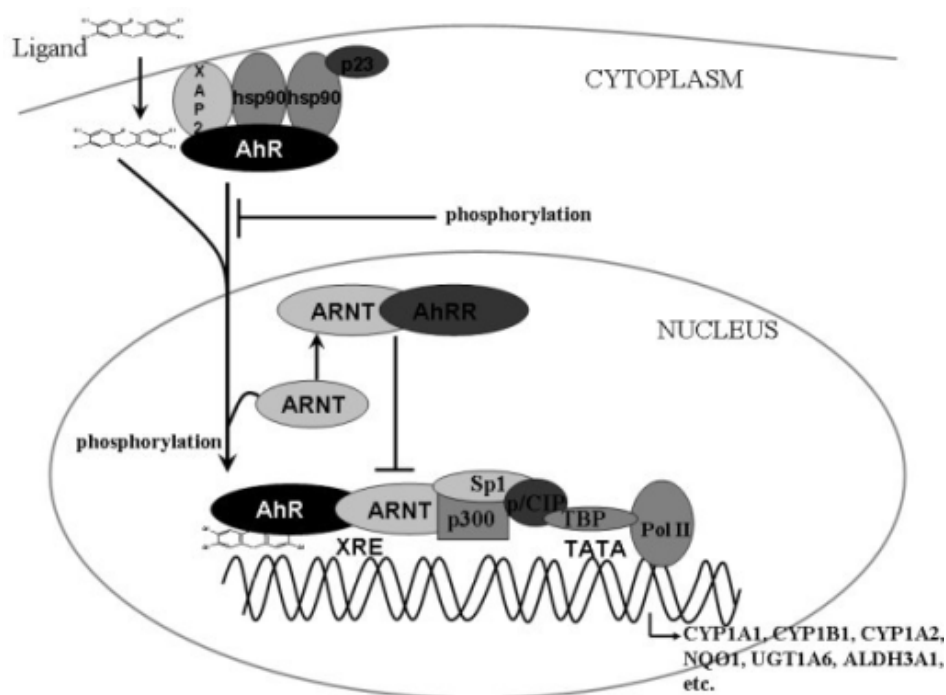


Obr. 2: Funkční domény Ah receptoru [31].

1.3.2. Signální dráha AhR

Neaktivovaný protein AhR , tedy bez navázaného ligandu, se nachází v cytosolu v proteinovém komplexu složeném z chaperonového proteinu HSP90 (heat shock protein), XAP2 (X-associated protein) a ko-chaperonu p23 [32]. HSP90 a XAP2 mají pro Ah receptor v cytoplasmě stabilizační funkci, chrání ho před proteolýzou a pomáhají mu udržet ligand-vázající konformaci [33].

Ah receptor je aktivován navázáním ligandu na PAS doménu, což vede ke konformační změně a rozpadu multiproteinového komplexu. Aktivovaný Ah receptor je translokován do jádra, kde dochází ke vzniku heterodimeru s ARNT proteinem (Ah receptor nuclear translocator) [32]. Takto vytvořený AhR-ARNT komplex je schopen se vázat s vysokou afinitou na specifické elementy DNA, označované jako DRE/XRE (dioxin/xenobiotic response element) a pomocí kofaktorů dochází ke změně v genové expresi cílových genů (např. CYP1A1 a 1A2) [34]. Celý tento proces je znázorněn na obrázku 3.



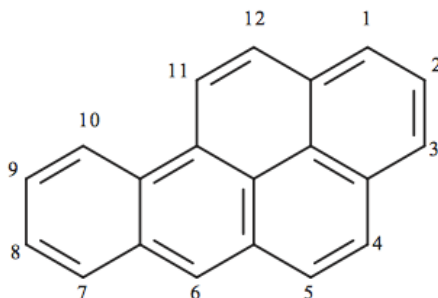
Obr. 3: Mechanismus signalizační dráhy Ah receptoru [35].

1.4. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)

Polycyklické aromatické uhlovodíky patří do skupiny organických látek, které se vyskytují ve všech složkách životního prostředí. Vznikají částečným spalováním organických látek, dále při spalování nafty, dřeva a mnoha jiných látek [36]. Mezi nejstudovanější z těchto látek patří benzo[a]pyren (BaP).

1.4.1. Benzo[a]pyren

BaP je typickým příkladem polycyklických aromatických uhlovodíků. Skládá se z pěti kondenzovaných benzenových kruhů (obr. 4) [37].



Obr. 4: Struktura benzo[a]pyrenu [38].

Tento polutant životního prostředí je produkován jak přirozeně tak i uměle. Přirozeně vzniká při lesních požárech a sopečné činnosti. Uměle je v životním prostředí produkován spalováním nafty a dalších fosilních paliv, tepelnou úpravou jídel a jiných spalovacích procesech. BaP je jednou z hlavních složek cigaretového kouře, kde se vyskytuje ve vysokých koncentracích. Z tohoto hlediska se jedná o nejvýznamnější karcinogen při vzniku rakoviny plic u kuřáků [3]. Ve stopovém množství se může také vyskytovat v půdě, vodě a potravinách. Do organismu se BaP dostává převážně inhalací znečištěného vzduchu a kouřením, perorální cestou při tepelné úpravě masa a v menší míře přes pokožku [38].

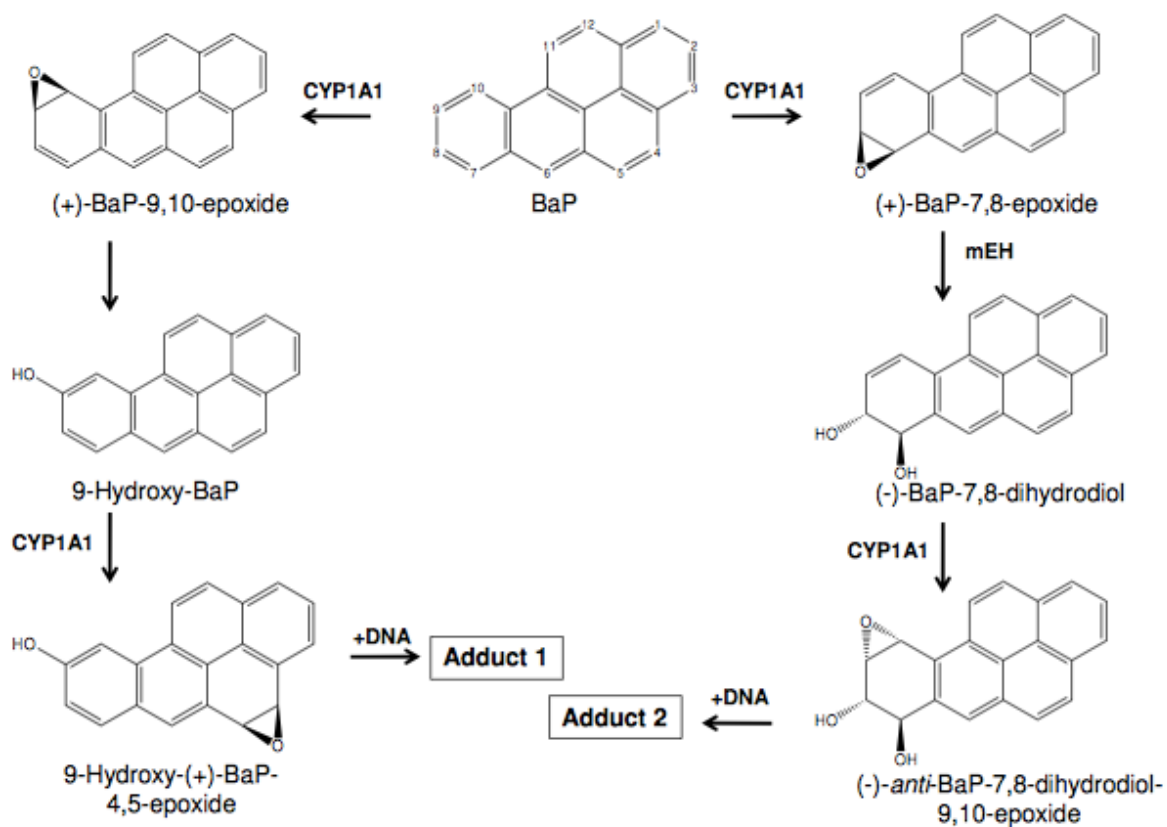
Již na počátku 19. století se BaP začal dostávat do spojení s rakovinou plic, kůže a jater u člověka [39]. Ve 20. století byl prokázán jako karcinogen u testovaných laboratorních zvířat: myši, potkanů, králíků a dalších pokusných zvířat. BaP je přeměňován pomocí epoxidhydrolasy a cytochromů P450 za vzniku karcinogenních metabolitů, které interakcí s DNA tvoří kovalentní adukty. BaP je odpovědný za zvýšení exprese cytochromů P450 1A1 a 1A2 při první i druhé fázi biotransformace vazbou na Ah receptor [38].

1.4.1.1. Metabolismus benzo[a]pyrenu

Benzo[a]pyren je prokarcinogen, který je dále aktivován na karcinogen. Přeměna BaP je závislá na jeho biotransformaci, která vede k tvorbě arenoxidů, dihydrodiolů, fenolů a chinonů [40]. Níže jsou popsány dvě nejznámější dráhy přeměny BaP. Hlavní dráha biotransformace BaP je znázorněna na obrázku 5 (str. 21).

První dráha:

Na metabolismu BaP se nejvýznamněji podílejí cytochromy P450 1A1, 1B1 a epoxidhydrolasy. BaP je nejprve oxidován CYP1A1 za vzniku BaP-7,8-epoxidu, který je dále přeměňován epoxidhydrolasou na BaP-7,8-dihydrodiol [41]. V dalším kroku je tento meziprodukt pomocí CYP1A1 a 1B1 přeměněn sekundární epoxidací na BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE), který je chráněn před hydrolýzou epoxidhydrolasou. Vzniklé diolepoxidy jsou transportovány do jádra, kde tvoří kovalentní adukty s DNA. Reagují především s puriny v DNA (deoxyguanosinem a deoxyadenosinem) a jsou schopné tvořit cis- i trans- adukty, což dává možnost vzniknout až 16-ti možným formám BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid-DNA aduktů [38]. BaP může být navíc oxidován CYP1A1 i na BaP-9,10-epoxid a dále až na 9-hydroxy-BaP-4,5-epoxid, který také reaguje s DNA (obr. 5, str. 21).



Obr. 5: Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu [41].

Druhá dráha:

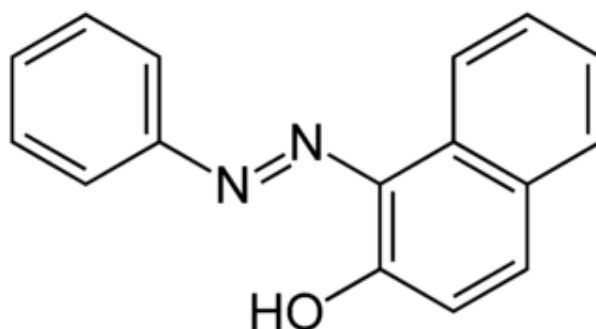
K aktivaci BaP dochází prostřednictvím aldo-keto reduktas (AKRs), což jsou monomerní cytosolové NADP(H)-závislé oxidoreduktasy, které katalyzují přeměnu BaP-7,8-dihydrodiolu na BaP-chinon. Tyto chinony jsou cytotoxické a genotoxické a mohou vytvářet adukty s DNA [42].

1.5. Azobarviva

Azobarviva patří mezi syntetická organická barviva s velkou strukturní rozmanitostí. Tato barviva mají široké využití od textilního, papírenského a potravinářského průmyslu až po využití v chemických laboratořích. Tyto látky jsou špatně odbourávány za aerobních podmínek, a proto mohou znečišťovat životní prostředí [43]. Některé z těchto látek vykazují karcinogenní a alergenní účinky. Jednou z takových látek je i Sudan I.

1.5.1. Sudan I

Sudan I [1-(fenylazo)-2-naftol] patří mezi azobarviva s typickou chromoforickou funkční vazbou -N=N- těchto látek (obr. 6).



Obr. 6: Struktura Sudanu I [44].

V první polovině 20. století byl Sudan I používán jako oranžové potravinářské barvivo v mnoha zemích Evropy, což bylo vyhodnoceno v roce 1975 Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) za nebezpečné z důvodu možné karcinogenity. Sudan I byl označen jako možný karcinogen a zařazen do 3. kategorie karcinogenů. Další výzkumy prokázaly, že se jedná o velmi silný alergen. Tato látka se v přírodě přirozeně nevyskytuje a dodnes se používá k barvení různých materiálů, jako jsou uhlovodíková rozpouštědla, oleje, tuky, vosky, plasty, tiskařské barvy, boty, podlahová leštidla a benzín [4]. I přes zákaz používání této látky v potravinářském průmyslu byla v několika zemích Evropské Unie v roce 2003 zjištěna přítomnost Sudanu I v chilli

práškovém koření a potravinách obsahující chilli prášek, kari, kurkumu a také v palmovém oleji. Tyto potraviny byly původem ze zemí mimo EU, převážně z Asie a Afriky [45].

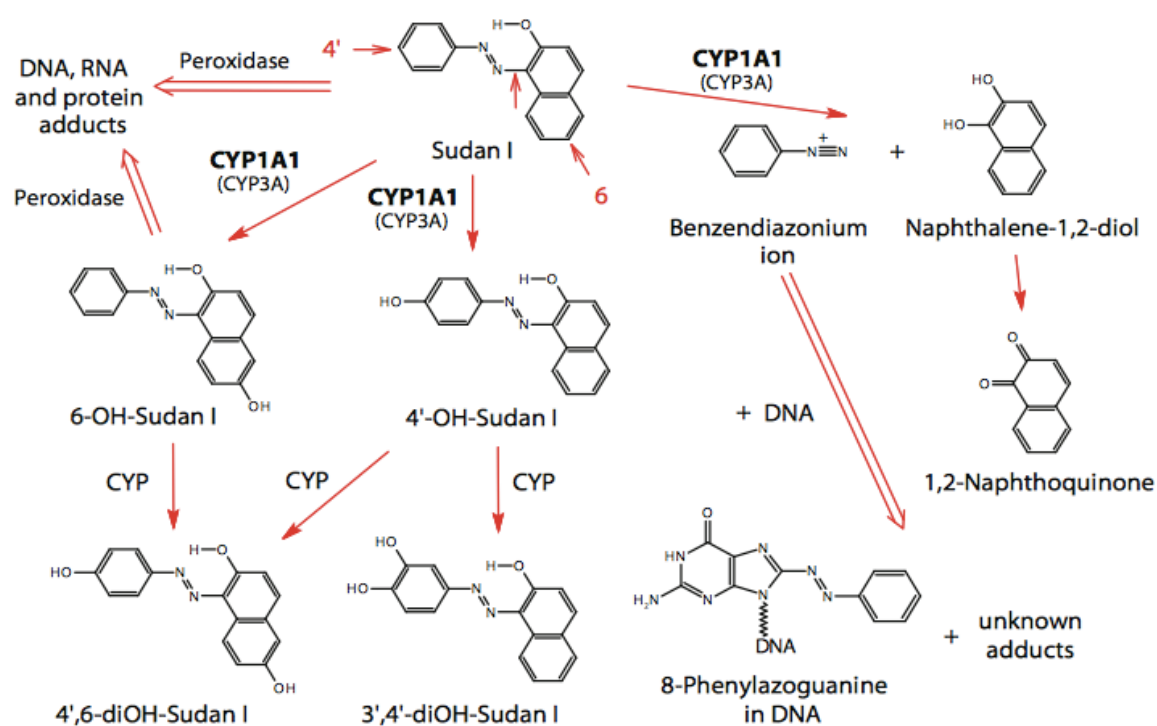
Sudan I je klastogenní sloučeninou, která má mutagenní účinek na bakteriální i savčí buňky. Genotoxický účinek této látky byl též prokázán po metabolické aktivaci jaterními cytochromy P450 a peroxidasami *in vitro* a u laboratorních potkanů, myši a králíků v játrech a močovém měchýři *in vivo* [46].

1.5.1.1. Metabolismus Sudanu I

Metabolismus Sudanu I je charakterizován pro potkany a králíky, u kterých probíhá především v játrech pomocí oxidačních a redukčních reakcí. Výzkumem těchto organismů byly zjištěny hlavní produkty oxidační přeměny Sudanu I vedoucí k tvorbě hydroxylovaných metabolitů. V poloze 4' benzenového kruhu vzniká 1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftol a v poloze 6 naftalenové části Sudanu I vzniká 1-(fenylazo)naftalen-2,6-diol. Právě tyto produkty oxidace Sudanu I byly nalezeny v moči a žluči testovaných zvířat a považují se za detoxikační metabolity vzniklé C-hydroxylací. [47,48]. Jako detoxikační mohou být označeny díky jejich snadnému vyloučení z organismu (obr. 7, str. 24)

Dalšími produkty C-hydroxylace jsou 1-(3,4-dihydroxyphenylazo)-2-naftol (3',4'-diOH-Sudan I) a 1-(4-fenylazo)-naphthalene-2,6-diol (4',6-diOH-Sudan I). Produktem oxidačního štěpení je benzendiazoniový ion, vznikající enzymatickým štěpením azoskupiny Sudanu I, který tvoří adukty s DNA. Jedním z hlavních aduktů metabolismu Sudanu I byl indetifikován jako 8-(fenylazo)guaninový adukt uvedený na obrázku 7 (str. 24) [47].

Bylo prokázáno, že Sudan I a jeho C-hydroxylované metabolity byly také oxidovány peroxidasami, což má za následek tvorbu aduktů na DNA, RNA a proteinech [48]. Výzkum Sudanu I prokázal jeho vliv na indukci cytochromů P450 1A a jejich aktivitu v játrech myší a potkanů, kde působí nejspíše jako ligand receptoru AhR [46].



Obr. 7: Schéma metabolismu Sudanu I [47].

2. Cíl práce

Předkládaná bakalářská práce byla součástí projektu Laboratoře molekulární karcinogenese a vývoje léčiv, zabývajícího se vlivem zvýšené exprese vybraných biotransformačních enzymů na genotoxicitu BaP *in vivo*. V rámci projektu bylo potřeba porovnat případné změny v expresi biotransformačních enzymů v orgánech laboratorního potkana vyvolané buď samostatným nebo společným působením Sudanu I, jako významného induktoru CYP1A1, a BaP.

Úkolem bakalářské práce bylo studium vlivu aplikace uvedených látek laboratorním potkanům samostatně nebo kombinovaně na expresi genů pro CYP1A1 a CYP1A2

Hlavní cíle bakalářské práce:

1. Izolovat celkovou RNA z jater, ledvin a plic laboratorních potkanů kontrolních a potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi.
2. Převést izolovanou RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA s využitím náhodných hexamerů jako primerů.
3. Metodou kvantitativní PCR porovnat relativní expresi genů pro CYP1A1 a CYP1A2 v orgánech laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Ambion	Nuclease Free H ₂ O
Applied Biosystems	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, RNase Inhibitor Gene Expression Master Mix
Bio Basic Inc.	Tris, kyselina boritá, EDTA
Fermentas	λDNA (EcoRI + Hind III) marker 6x DNA Loading Dye
Geneaid	GENEzol™ Reagent
Lach-Ner	Isopropanol, Ethanol
Life Technologies	TaqMan Gene Expression Assay: CYP1A1 – Rn00487218_m1 CYP1A2 – Rn00561082_m1 β-aktin – Rn0066789_m1 SYBR® Safe DNA gel Stain Gel Loading Dye, Blue (6x)
Linde	Tekutý dusík, suchý led
Molecular Probes	SYBR® Green II RNA Gel Stain
Penta	Chloroform
Thermo Scientific	GeneRuler 100bp DNA ladder

3.2. Použité přístroje

Centrifuga	Centrifuge Eppendorf 5415R
PCR cykler	Techne (Techgene)
Transilluminator	DarkReader DR-45M
Laminární box	Labox
Real-time PCR cykler	RotorGene 2000 (Corbett Research)
Spektrofotometr	Helios α

Termoblok	VLMLS1
Vortex	VELPS scientifica Rx3
Zdroj napětí	Electrophoresis Power Supply-EPS 301

3.3. Použité metody

3.3.1. Premedikace potkanů

Potkani kmene Wistar byli vystaveni účinku azobarviva Sudan I podávanému intraperitoneálně, benzo[*a*]pyrenu podávanému žaludeční sondou a jejich kombinací dle schématu uvedeného v tabulce 1. Obě látky byly rozpuštěny v oleji. V každé premedikační skupině byli tři laboratorní potkani.

Tab. 1: *Schéma aplikace látek laboratorním potkanům.*

Dávka:	Sudan I	50 mg/kg váhy potkana
	BaP	150 mg/kg váhy potkana

Skupina	Látka	1. den	2. den
S	Sud I	Olej	Sud I
B	BaP	Olej	BaP
SB	Sud I+BaP	Sud I	BaP
BS	BaP+Sud I	BaP	Sud I
K	kontrola	Olej	Olej

Třetí den byla zvířata usmrcena a byly z nich odebrány orgány, které byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při teplotě -80°C.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č. 419/2012 Sb. v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 2).

Tato experimentální část, premedikace potkanů, nebyla prováděna v rámci této bakalářské práce. Pracovalo se tedy již s přichystanými orgány.

3.3.2. Izolace RNA

Izolace RNA byla prvním krokem pro dosažení výsledků bakalářské práce. Získání vysoce kvalitní RNA je velmi náročné, jelikož se jedná o nestabilní nukleové kyseliny a všudypřítomné ribonukleasy (RNasy) RNA rychle degradují. Ribonukleasy nejdou jednoduše inaktivovat, tudíž se musí dbát vysoké ostražitosti před kontaminací vzorku s RNA [49]. Pro izolaci RNA se využívá činidla složeného z fenolu, chloroformu a guanidin isothiokyanátu – GENEzol™. Toto činidlo umožňuje extrakci RNA z celé řady vzorků, např. krev, kultivované buňky a homogenizované tkáně [50]. Z důvodu možné degradace RNA ribonukleasami je nutné pracovat sterilně a v rukavicích bez pudru.

Třecí misky, tloučky, špachtle, pinzety a kádinky byly omyty 10% peroxidem vodíku, „RNase free“ vodou, zabaleny do alobalu a vloženy do sušárny na dobu 6h při teplotě 180 °C. Špičky s filtry a plastové mikrozskumavky byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 134 °C po dobu 20 minut. Před zahájením izolace byl 10% peroxidem sterilizován laminární box (Flow-box) a do něj vloženy veškeré potřebné nástroje. Pipety se stojanem, mikrocetrifuga, stojany na mikrozskumavky byly ošetřeny 70% ethanolem a také vloženy do flow-boxu, který byl následně vysvícen UV světlem po dobu cca 15 minut.

Pro homogenizaci byly části jednotlivých orgánů potkanů ze stejné premedikační skupiny spojeny. Ze společného homogenátu spojených tkání byly provedeny tři paralelní izolace RNA. Homogenizace probíhala tloučkem v třecí misce pomocí mražení tekutým dusíkem N₂. Jednotlivé vzorky byly převedeny do 1 ml GENEzol™ Reagent, promíchány na vortexu a inkubovány asi 5 minut při pokojové teplotě.

V dalším kroku izolace bylo přidáno 200 μ l chloroformu a RNA byla extrahována třepáním na vortexu po dobu 20 sekund. Po inkubaci při pokojové teplotě po dobu 3 minut byly vzorky centrifugovány po dobu 15 minut při 12 000 x g a teplotě 4 °C. Po centrifugaci následovalo odebrání horní vodné fáze obsahující RNA do nových mikrozkušavek tak, aby se vzorek nekontaminoval nabráním mezifáze obsahující DNA a proteiny.

Ke každému vzorku byl přidán isopropanol v množství odpovídající objemu odebrané vodné fáze s RNA. Po 10-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě následovala centrifugace po dobu 15 minut při 12 000 x g a teplotě 4 °C. Supernatant byl slit do odpadní kádinky a k peletám přidán 1 ml 75% ethanolu. Vzorky byly vortexovány a poté centrifugovány 5 minut při 12 000 x g a teplotě 4 °C. Supernatant byl pipetou odstraněn a pelety sušeny na termobloku, maximálně 10 minut při 60 °C do odpaření zbývajících ethanolu.

Na závěr byly vzorky ředěny „RNase free“ vodou, vortexovány a inkubovány v termobloku 15 minut při 60 °C. Izolovaná RNA byla rozpipetována na aliquoty a uchována v vysokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.3. Horizontální elektroforéza RNA na agarosovém gelu

Erlenmeyerova baňka, odměrné válce (250 a 500 ml) a aparatura na elektroforézu byly předem omyty 10% peroxidem vodíku a následně opláchnuty „RNase free“ vodou. Ze zásobního roztoku 5x TBE pufru (445mM TRIS; 445mM kyselina boritá; 10mM EDTA; pH 8-8,3) byl ředěním připraven 0,5x TBE pufr. Bylo připraveno 40 ml 1% agarosového gelu v 0,5x TBE pufru. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarosy. Poté ochlazena pod proudem tekoucí vody a roztok nalit do připravené formy

na gel. Před ztuhnutím byl vložen hřeben pro vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí byla forma s gelem vložena do vaničky na elektroforézu, která byla naplněna 0,5x TBE pufrem.

Ke vzorkům izolované RNA (4 µl) bylo pipetováno 0,8 µl vzorkového pufru (6x Gel Loading dye), který sloužil ke zviditelnění vzorků v průběhu elektroforézy. Marker byl připraven dle protokolu výrobce (1 µl λDNA EcoRI + HinDIII + 4 µl „RNase free“ vody + 1 µl 6x Gel Loading dye), byl zahříván při 65 °C po dobu 5 minut a poté vložen na led po dobu 3 minut. Do jamek gelu bylo pipetováno celé množství každého vzorku a 5 µl markeru. Elektroforetická aparatura byla uzavřena a po připojení aparatury ke zdroji napětí probíhala elektroforéza 35 – 40 minut při napětí 110 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do barvicí lázně obsahující barvivo Syber Green II 10 000x v DMSO (50 ml 1x TBE a 5 µl Syber Green II). Gel byl v lázni na třepačce po dobu 30 minut a následně vizualizován na Dark Readeru (Tran-silluminator DR-45M) a vyfotografován.

3.3.4. Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace bylo potřeba proměřit absorbanci vzorku při 260, 280 a 320 nm. Absorpční maximum nukleových kyselin je při vlnové délce 260 nm. Výpočet čistoty RNA se provádí z poměru absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm, při které absorbují nejvíce proteiny. Hodnotu absorbance při vlnové délce 320 nm je nutné odečíst od každé hodnoty jako absorbanci pozadí. Pro stanovení čistoty RNA, která by se měla pohybovat od 1,8 do 2,0, získáme poměr ve tvaru:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Před měřením bylo potřeba vzorky naředit a to tak, že k 5 µl vzorku bylo přidáno 395 µl „RNase free“ vody. Na spektrofotometru Helios α bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek od 240 do 330 nm. Toto absorpční spektrum se nachází v UV oblasti a tudíž bylo třeba použít křemenné kyvety. Koncentrace RNA $c = 40 \mu\text{g/ml}$ odpovídá absorbanci $A = 1$.

Pro zjištění koncentrace RNA ve vzorku byl použit vzorec:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \times 40 \times \text{ředění} \quad [c] = \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$$

3.3.5. Reverzní transkripce – syntéza cDNA

Reverzní transkripce je metoda přepisu izolované RNA do cDNA (complementary DNA). Reakce, při které je syntetizována cDNA, je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou, což je RNA-dependentní DNA polymerasa [51]. Nezbytným krokem reverzní transkripce je nasednutí oligonukleotidu na RNA templát. Pro tento proces se využívá dvou základních oligonukleotidů, a to oligo-dT řetězec a náhodných hexamerů [52].

Práce probíhala stejně jako v případě izolace RNA ve sterilním prostředí Flow-boxu za použití rukavic bez pudru. Během přípravy byly vzorky co nejvíce uchovávány na ledu. Nejprve byla pro všechny vzorky připravena výchozí směs (2x RT master mix) obsahující na jeden vzorek:

10× RT pufr	2 µl
25× dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10× RT Random Primers	2 µl
RNase inhibitor	1 µl
RNase free voda	4,2 µl

Množství vzorku RNA obsahující 1 µg RNA bylo naředěno na objem 10 µl „RNase free“ vodou. K takto připraveným vzorkům bylo pipetováno

10 μ l 2x RT master mixu. Ze všech vzorků byly odebrány 2 μ l, které sloužily jako negativní kontrola. Posledním krokem bylo přidání 1 μ l MultiScribe™ reversní transkriptasy k vzorkům, ze kterých byla předtím odebrána negativní kontrola. Vzorky i negativní kontroly byly centrifugovány na mikrocentrifuze a uchovány na ledu.

Připravené vzorky byly vloženy do PCR cykleru (Techgene) a byl spuštěn program pro reverzní transkripci. Tento program má následující reakční nastavení:

10 min (nasednutí náhodných hexamerů)	25 °C
120 min (prodlužování řetězce cDNA)	37 °C
5 min (inaktivace reverzní transkriptázy)	85 °C

Po skončení celého programu nastává chlazení na teplotu 4 °C. Po vyjmutí byly vzorky uskladněny ve vysokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.6. Real-time (kvantitativní) PCR

PCR je metoda s širokým využitím pro zkoumání DNA, má velký dynamický rozsah, obrovskou citlivost a je vysoce sekvenčně specifická. Pro použití této metody je třeba templátu DNA a to jedno- či dvouvláknového. Kvantitativní PCR se nejběžněji využívá pro analýzu genové exprese, chromozomových aberací, detekci patogenů, jednonukleotidový polymorfismus a kvantifikaci mRNA [53,54].

Kvantitativní PCR (qPCR) je metoda založená na sběru dat během celého procesu PCR. Jedná se o kombinaci amplifikace a její detekce v každém kroku, které je dosaženo použitím fluorescenčních látek. Koncentrace produktu PCR koreluje s intenzitou fluorescence [54]. Během qPCR dochází ke štěpení TaqMan sondy za využití 5' nukleasové aktivity DNA polymerasy. Jedná

se o hydrolyzační sondu, která obsahuje na svém 5' konci značící fluorescenční činidlo a na 3' konci zhasací činidlo. V průběhu reakce dochází ke zvyšování fluorescence, která je způsobená oddalováním fluorescenčního a zhasacího barviva [55].

Metoda qPCR se dělí do čtyř hlavních fází: lineární fáze, časné exponenciální fáze, exponenciální fáze a fáze plató. V časné exponenciální fázi dosáhne fluorescence své prahové hodnoty, kdy je větší než fluorescence pozadí a právě tento cyklus se označuje C_T . Tato hodnota představuje množství původního vzorku a používá se k experimentálnímu vyhodnocení [54].

Nejprve bylo potřeba vzorky cDNA a negativní kontroly naředit 10x „RNase free“ vodou. Následně bylo pipetováno 15 μ l předem připraveného „PCR mixu“ do připravených PCR mikrozkušavek, který na jeden vzorek obsahoval:

10 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix

1 μ l TaqMan Gene Expression Assay (β -aktin, CYP1A1 nebo CYP1A2)

4 μ l „RNase Free“ voda

K 15 μ l „PCR mixu“ bylo pipetováno 5 μ l naředěné cDNA a jako blank bylo přidáno místo vzorku cDNA 5 μ l „RNase free“ vody. Pro jednotlivé vzorky tkání byly připraveny dvě paralelní stanovení. Takto připravené vzorky byly vloženy do Real-time PCR cycleru Rotor Gene 2000. Pomocí programu Rotor Gene 5 byly nastaveny následující reakční podmínky:

50°C po dobu 2 minut

95°C po dobu 10 minut (aktivace DNA polymerasy)

Následovalo 50 opakujících se cyklu s podmínkami:

95°C po dobu 15 sec (denaturace DNA řetězce)

60°C po dobu 60 sec (nasednutí primerů a sondy a syntéza řetězce DNA)

K vyhodnocení byl použit také program Rotor Gene 5, pomocí kterého byly určeny hodnoty C_T , značící číslo cyklu, ve kterém amplifikační křivka protíná linii „threshold“ se signifikantním nárůstem detekce signálu.

3.3.7. Analýza dat kvantitativní PCR (relativní kvatifikace)

Kromě cílových genů CYP1A1 a CYP1A2 byla kvantitativní PCR provedena i pro β -aktin jako referenční gen s konstantní expresí. Z výsledků dvou paralelních měření pro každý vzorek cDNA byla vypočítána hodnota aritmetického průměru čísla cyklu C_T , vyjadřující relativní zastoupení sledovaných genů ve vzorku. Porovnáním hodnot C_T cílových genů a genu referenčního byla určena hodnota ΔC_T dle vzorce:

$$\Delta C_{T,1A1} = C_{T(CYP1A1)} - C_{T(\beta-aktin)}$$

$$\Delta C_{T,1A2} = C_{T(CYP1A2)} - C_{T(\beta-aktin)}$$

Výpočet míry indukce exprese genů CYP1A1 a 1A2 ve vzorcích dané tkáně izolované z potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi proti tkáni potkanů nepremedikovaných je vyjádřen pomocí hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$, která je počítána dle vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\overline{\Delta C_T}(\text{premedikace}) - \overline{\Delta C_T}(\text{kontrola}))}$$

Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí programu REST 2009.

3.3.1. Horizontální elektroforéza vzorků DNA na agarosovém gelu

Tato metoda sloužila pro kontrolu vzorků po „real-time“ PCR k vyhodnocení, zda se ve vzorcích vyskytuje pouze příslušný úsek DNA syntetizovaný ze sledovaných genů (β -aktin, CYP1A1 a 1A2).

Byl připraven 1x TBE pufr ze zásobního roztoku 5x TBE (445mM TRIS; 445mM kyselina boritá; 10mM EDTA; pH 8-8,3). 2,5% agarosový gel byl vytvořen smícháním 60 ml 1x TBE pufru a 1,5 g agarosu v Erlenmeyerově baňce. Směs byla vložena do mikrovlnné trouby a zahřívána. Po rozpuštění bylo k roztoku přidáno barvivo SYBR Safe DNA (10 000x koncentrované), roztok byl nalit do formy pro elektroforetický gel a vložen hřeben pro jamky na vzorky. Tuhý gel byl vložen do elektroforetické aparatury a ta naplněna 1x TBE puftrem.

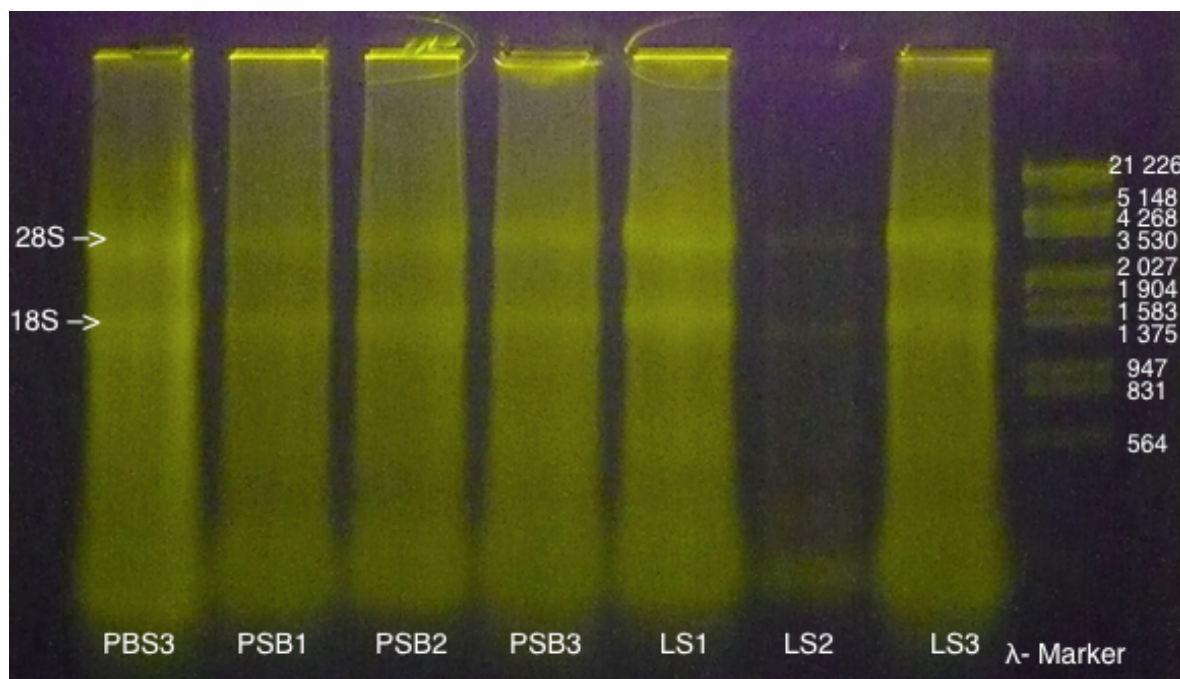
Marker byl připraven smícháním 2 μ l DNA ladder, 3 μ l destilované vody a 1 μ l 6x DNA Loading Dye a k 10 μ l vzorků byly přidány 2 μ l vzorkového pufru (6x DNA Loading Dye). Takto připravené vzorky byly pipetovány do jednotlivých jamek. Elektroforetická aparatura byla uzavřena a po připojení aparatury ke zdroji napětí probíhala elektroforéza 40 minut při napětí 100 V. Po ukončení elektroforézy byl gel se vzorky vizualizován na Dark Readeru (Tran-silluminator DR-45M) a vyfotografován.

4. Výsledky

K určení obsahu mRNA pro enzymy CYP1A1 a CYP1A2 bylo nutné izolovat celkovou RNA z jater, ledvin a plic laboratorních potkanů, kterým byl podáván benzo[*a*]pyren, Sudan I a jejich kombinace a potkanů kontrolních, nepremedikovaných. Následně byla izolovaná RNA převedena na cDNA metodou reverzní transkripce s použitím náhodných hexamerů jako primerů. S využitím komerčních sond byla na získané cDNA analyzována exprese genů metodou „real-time“ PCR.

4.1. Izolace celkové RNA

Pomocí činidla GENEzol™ Reagent byla provedena izolace celkové RNA ze všech odebraných tkání (viz. kapitola premedikace potkanů). Kvalita izolované RNA byla analyzována elektroforézou na 1% agarosovém gelu, na kterém byly po vizualizaci patrné dva proužky odpovídající 28S a 18S rRNA (obr. 8), které jsou důkazem nedegradované RNA.



Obr. 8: Ukázka elektroforézy vzorků izolované RNA na agarosovém gelu. Vzorky plic s kombinací premedikace BaP a SI (PBS3 a PSB1–3) a vzorky ledvin s premedikací SI (LS1–3).

Pomocí spektrofotometrického měření absorpčních spekter byla izolovaná RNA hodnocena z hlediska výtěžku a čistoty. Absorpční maximum UV spektra vzorků by mělo být při vlnové délce 260 nm. Vzorky byly před měřením 80x ředěny „RNase free“ vodou. Získané hodnoty čistoty a koncentrace RNA u jednotlivých tkání jsou uvedeny v tabulkách 2, 3 a 4 (str. 37 a 38).

Tab. 2: *Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované jaterní RNA.*

Premedikace	Vzorek	Čistota	C _{RNA} [μg. μl ⁻¹]
Kontrola	JK1	1,95	2,21
	JK2	1,54	3,71
	JK3	1,88	2,27
BaP	JB1	2,01	3,65
	JB2	1,94	4,90
	JB3	1,97	4,83
Sudan I	JS1	2,01	4,66
	JS2	1,92	4,22
	JS3	1,95	3,94
BaP + Sudan I	JBS1	2,01	2,73
	JBS2	1,83	2,19
	JBS3	1,81	2,11
Sudan I + BaP	JSB1	1,88	3,02
	JSB2	1,84	2,60
	JSB3	1,93	1,73

Tab. 3: *Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované RNA z tkáně ledvin.*

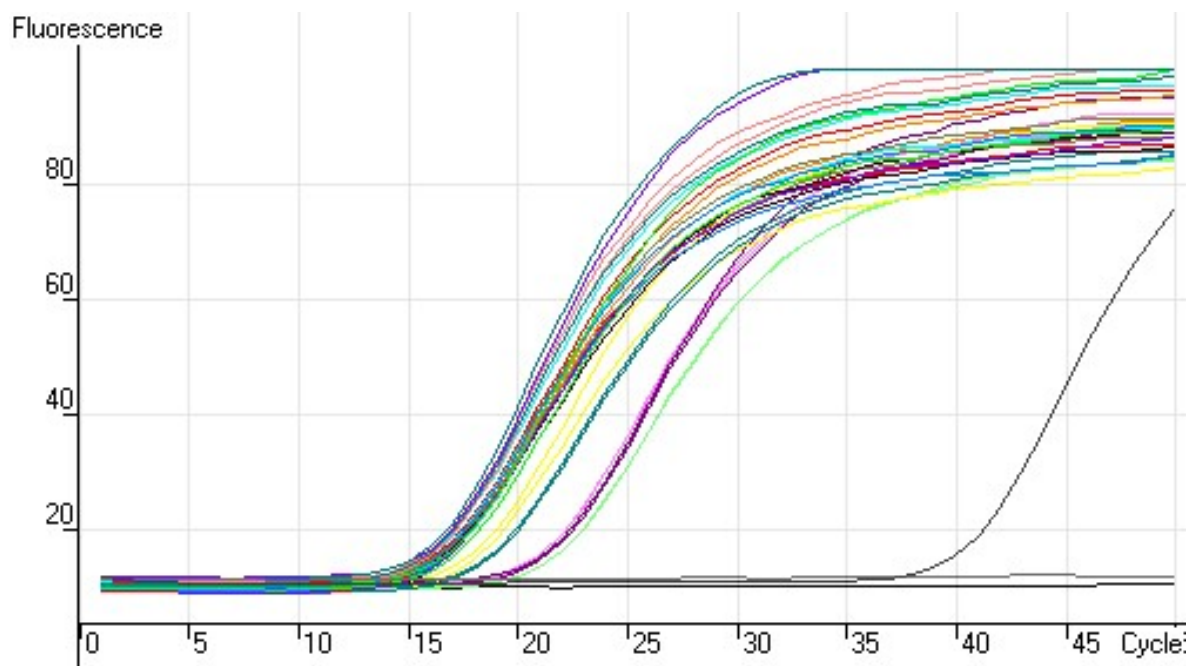
Premedikace	Vzorek	Čistota	C _{RNA} [μg. μl ⁻¹]
Kontrola	LK1	1,85	2,21
	LK2	2,03	3,71
	LK3	1,87	2,27
BaP	LB1	2,03	3,65
	LB2	2,00	4,90
	LB3	2,01	4,83
Sudan I	LS1	2,02	4,66
	LS2	2,04	4,22
	LS3	2,02	3,94
BaP + Sudan I	LBS1	1,92	2,31
	LBS2	1,90	1,98
	LBS3	1,82	2,11
	LBS4	1,92	2,73
Sudan I + BaP	LSB1	1,86	3,02
	LSB2	1,90	2,60
	LSB3	1,99	1,73

Tab. 4: *Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované plicní RNA.*

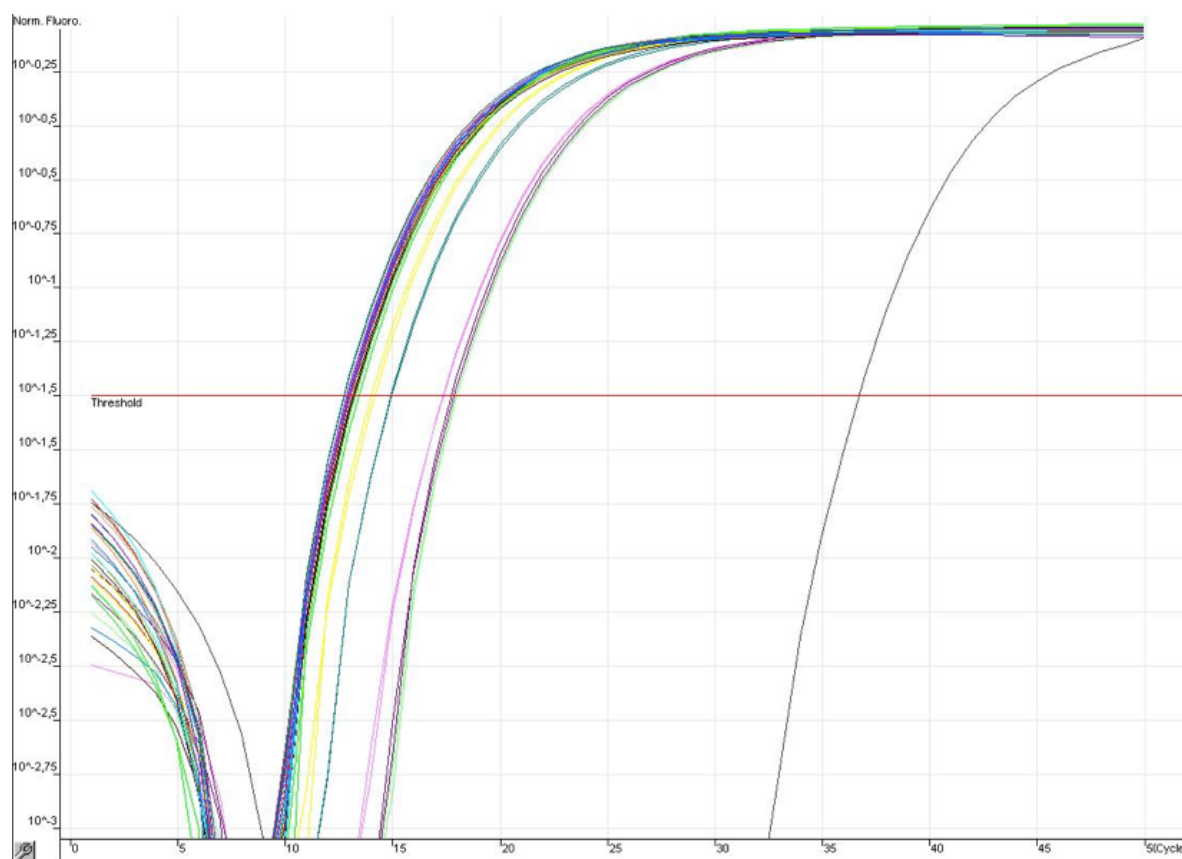
Premedikace	Vzorek	Čistota	C _{RNA} [μg. μl ⁻¹]
Kontrola	PK1	2,04	1,26
	PK2	1,94	1,48
	PK3	2,09	1,16
BaP	PB1	1,99	0,87
	PB2	1,94	1,08
Sudan I	PS1	1,92	1,12
	PS2	1,94	0,94
	PS3	2,04	0,68
BaP + Sudan I	PBS1	1,87	0,80
	PBS2	1,91	0,73
	PBS3	1,94	1,29
	PBS4	1,96	1,41
Sudan I + BaP	PSB1	1,98	0,29
	PSB2	1,95	1,15
	PSB3	2,00	0,92

4.2. Relativní kvantifikace mRNA pro CYP1A1 a CYP1A2

Pomocí reverzní transkripce byla z 1 μg získané RNA připravena cDNA. Vzorky byly dále analyzovány metodou kvantitativní PCR z hlediska exprese β -aktinu jako referenčního genu, který by měl být ve všech tkáních exprimován ve stejném množství. Analýza exprese genů CYP1A1 a 1A2 byla prováděna stejným způsobem jako u β -aktinu. Ukázka výsledných amplifikačních křivek je na obrázcích 9 a 10 (str. 39), pomocí kterých byly určeny hodnoty C_T. Výsledná relativní zastoupení genů pro CYP1A1 a 1A2 v porovnání s β -aktinem jsou uvedena v tabulkách 5, 6 a 7 (str. 40 a 41).



Obr. 9: Amplifikační graf vzorků jater pro gen CYP1A2 v lineárním zobrazení.



Obr. 10: Amplifikační graf vzorků jater pro gen CYP1A2 v logaritmické uspořádání s označenou linií "threshold".

Tab. 5: Relativní míra exprese CYP1A1 a 1A2 (ΔC_T) v játrech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, SI a jejich kombinacemi.

Játra	β – aktin	CYP1A1		CYP1A2	
	$C_{T(\beta-aktin)}$	$C_{T(CYP1A1)}$	ΔC_T	$C_{T(CYP1A2)}$	ΔC_T
JK1	18,48	26,77	8,29	17,39	-1,10
JK2	18,72	26,95	8,23	18,02	-0,70
JK3	18,70	27,09	8,39	17,84	-0,86
JB1	18,97	15,22	-3,75	13,22	-5,75
JB2	18,73	15,29	-3,44	12,99	-5,75
JB3	18,65	15,26	-3,39	12,96	-5,69
JS1	19,85	16,28	-3,57	14,09	-5,77
JS2	20,90	17,92	-2,98	14,94	-5,96
JS3	18,87	15,63	-3,24	13,19	-5,68
JBS1	18,66	14,51	-4,15	12,89	-5,77
JBS2	18,78	14,68	-4,10	12,98	-5,81
JBS3	18,34	14,52	-3,82	12,83	-5,52
JSB1	18,39	15,17	-3,22	12,96	-5,43
JSB2	18,27	15,88	-2,39	13,36	-4,92
JSB3	18,08	15,23	-2,85	12,76	-5,32

Tab. 6: Relativní míra exprese CYP1A1 a 1A2 (ΔC_T) v ledvinách potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, SI a jejich kombinacemi.

Ledviny	β – aktin	CYP1A1		CYP1A2	
	$C_{T(\beta-aktin)}$	$C_{T(CYP1A1)}$	ΔC_T	$C_{T(CYP1A2)}$	ΔC_T
LK1	16,74	23,69	6,96	32,53	15,79
LK2	17,37	24,58	7,22	33,97	16,61
LK3	17,14	24,11	6,97	33,59	16,45
LB1	18,15	18,93	0,78	31,80	13,66
LB2	16,68	18,54	1,86	29,14	12,47
LB3	18,60	19,42	0,82	30,30	11,70
LS1	16,66	17,22	0,56	24,31	7,65
LS2	17,76	15,04	-2,72	12,86	-4,90
LS3	17,76	18,01	0,25	25,58	7,82
LBS1	20,55	20,62	0,07	32,28	11,74
LBS2	17,67	16,43	-1,25	29,67	12,00
LBS3	19,18	18,79	-0,40	30,15	10,97
LBS4	17,58	17,03	-0,55	29,50	11,92
LSB1	17,28	18,21	0,93	30,27	12,99
LSB2	20,44	21,68	1,24	32,43	11,99
LSB3	17,45	18,26	0,81	30,02	12,57

Tab. 7: Relativní míra exprese CYP1A1 a 1A2 (ΔC_T) v plicích potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, SI a jejich kombinacemi.

Plíce	β – aktin	CYP1A1		CYP1A2	
	$C_{T(\beta-aktin)}$	$C_{T(CYP1A1)}$	$\Delta C_{T(CYP1A1)}$	$C_{T(CYP1A2)}$	$\Delta C_{T(CYP1A2)}$
PK1	15,10	26,54	11,44	27,41	12,32
PK2	15,20	26,47	11,27	27,66	12,46
PK3	14,79	25,83	11,04	27,34	12,55
PB1	15,20	16,73	1,54	26,24	11,04
PB2	15,32	16,80	1,48	26,15	10,83
PS1	15,23	16,59	1,36	25,68	10,45
PS2	14,96	16,37	1,41	25,97	11,01
PS3	14,98	16,50	1,52	26,27	11,29
PBS1	14,84	16,25	1,41	20,64	5,80
PBS2	15,06	16,42	1,36	21,44	6,38
PBS3	15,20	16,72	1,52	24,85	9,65
PBS4	15,41	16,68	1,27	25,40	10,00
PSB1	12,45	14,43	1,99	21,30	8,85
PSB2	14,93	16,58	1,65	24,42	9,49
PSB3	14,91	16,55	1,64	24,38	9,47

Relativní míra genové exprese CYP1A1 a 1A2 v jednotlivých orgánech potkanů premedikovaných BaP, Sudanem I a jejich kombinacemi byla porovnána s potkany nepremedikovanými a dále byl určen rozsah změny exprese cílových genů v jednotlivých premedikačních skupinách. Data byla zpracována pomocí programu REST2009 a vyhodnocena signifikace výsledků (Tab. 8-10, obr. 11-12).

Tab. 8: Relativní kvantifikace genů CYP1A1 a 1A2 v jaterních vzorcích.

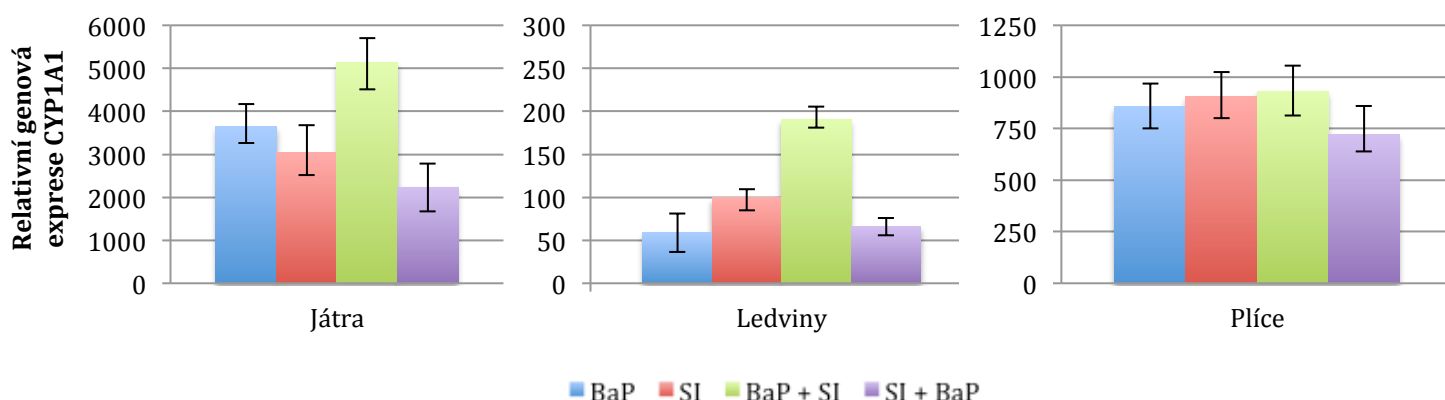
CYP1A1	$\overline{\Delta C_T^{CYP1A1}} \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
JK	$8,30 \pm 0,08$	-	-
JB	$-3,53 \pm 0,20$	3640	* (P<0,05)
JS	$-3,26 \pm 0,30$	3030	** (P<0,01)
JBS	$-4,02 \pm 0,18$	5140	* (P<0,05)
JSB	$-2,82 \pm 0,42$	2230	*** (P<0,001)
CYP1A2	$\overline{\Delta C_T^{CYP1A2}} \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
JK	$-0,89 \pm 0,20$	-	-
JB	$-5,73 \pm 0,03$	28,6	* (P<0,05)
JS	$-5,80 \pm 0,14$	30,1	*** (P<0,001)
JBS	$-5,70 \pm 0,16$	28,0	*** (P<0,001)
JSB	$-5,22 \pm 0,27$	20,2	* (P<0,05)

Tab. 9: Relativní kvantifikace genů CYP1A1 a 1A2 v ledvinových vzorcích.

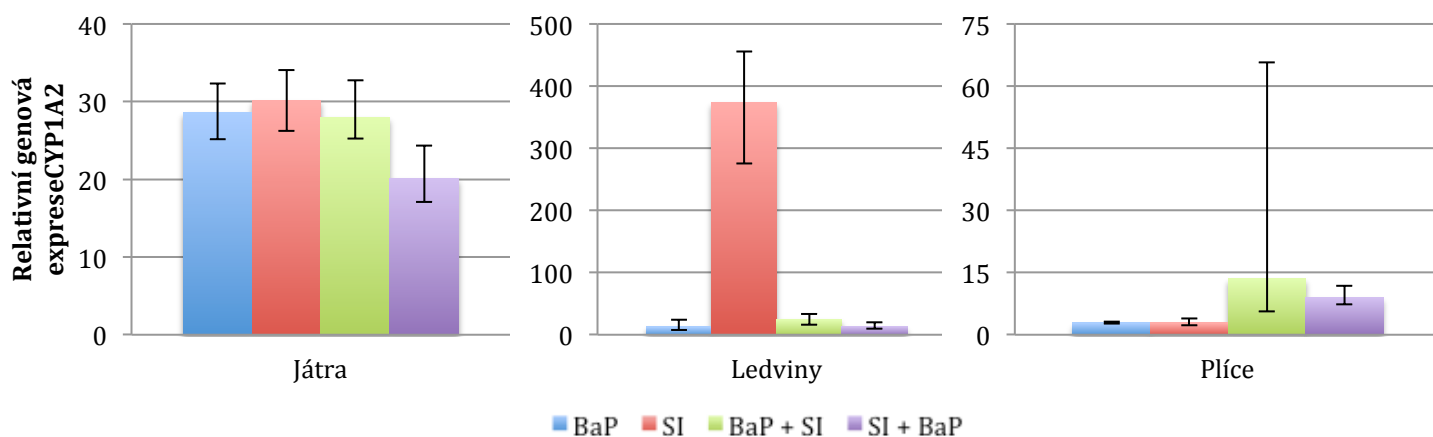
CYP1A1	$\overline{\Delta C_T^{CYP1A1}} \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
LK	$7,05 \pm 0,15$	-	-
LB	$1,15 \pm 0,61$	59,4	*** (P<0,001)
LS	$0,41 \pm 0,41$	99,7	*** (P<0,001)
LBS	$-0,53 \pm 0,55$	191	* (P<0,05)
LSB	$0,99 \pm 0,22$	66,4	*** (P<0,001)
CYP1A2	$\overline{\Delta C_T^{CYP1A2}} \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
LK	$16,28 \pm 0,43$	-	-
LB	$12,61 \pm 0,99$	12,8	*** (P<0,001)
LS	$7,74 \pm 0,12$	374	*** (P<0,001)
LBS	$11,65 \pm 0,47$	24,7	* (P<0,05)
LSB	$12,52 \pm 0,50$	13,6	*** (P<0,001)

Tab. 10: Relativní kvantifikace genů CYP1A1 a 1A2 v plicních vzorcích.

CYP1A1	$\overline{\Delta C_T^{CYP1A1}} \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
PK	$11,25 \pm 0,20$	-	-
PB	$1,51 \pm 0,04$	857	*** (P<0,001)
PS	$1,43 \pm 0,08$	904	*** (P<0,001)
PBS	$1,39 \pm 0,11$	929	* (P<0,05)
PSB	$1,76 \pm 0,20$	719	* (P<0,05)
CYP1A2	$\overline{\Delta C_T^{CYP1A2}} \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
PK	$12,44 \pm 0,20$	-	-
PB	$10,94 \pm 0,15$	2,84	-
PS	$10,92 \pm 0,43$	2,88	* (P<0,05)
PBS	$8,67 \pm 2,00$	13,6	* (P<0,05)
PSB	$9,27 \pm 0,36$	9,01	*** (P<0,001)



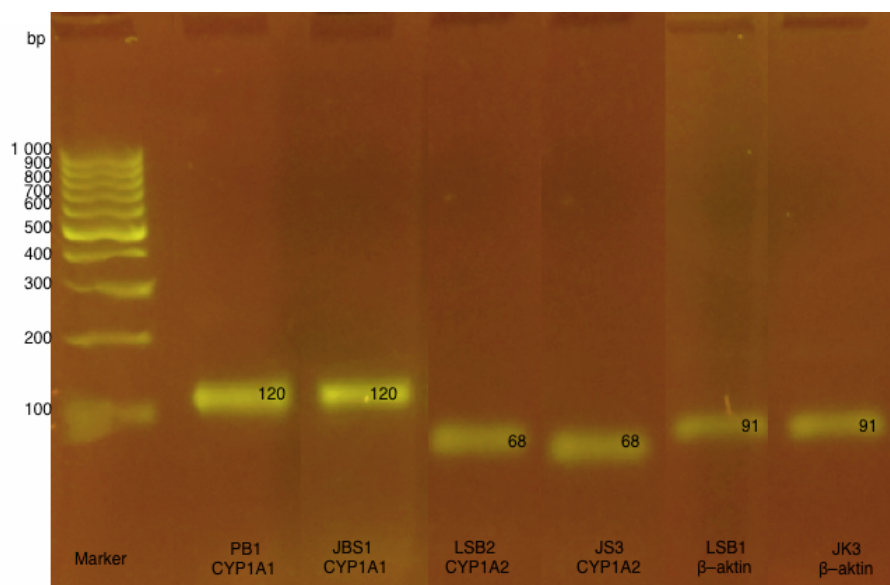
Obr. 11: Grafy relativní genové exprese CYP 1A1 v játrech, ledvinách a plicích potkanů premedikovaných BaP, SI a jejich kombinací v porovnání s nepremedikovanými potkany, výsledky vyjádřeny jako hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm S.E.$ (standardní chyba měření vyhodnocená programem REST 2009).



Obr. 12: Grafy relativní genové exprese CYP 1A2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů premedikovaných BaP, SI a jejich kombinací v porovnání s nepremedikovanými potkany, výsledky vyjádřeny jako hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm S.E.$ (standardní chyba měření vyhodnocená programem REST 2009).

4.3. Elektroforéza syntetizovaných úseků DNA

U náhodně vybraných vzorků byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu pro ověření, zda během kvantitativní PCR došlo k namnožení pouze požadovaných úseků DNA. Tato kontrolní elektroforéza potvrdila v každém vzorku přítomnost pouze jednoho nasyntetizovaného



fragmentu DNA (obr. 13) odpovídajícího svou délkou úsekům studovaných genů dle údajů výrobce použitých „TaqMan Gene Expression Assays“ (CYP1A1 – 120 párů bazí, CYP1A2 – 68 párů bazí, β -aktin – 91 párů bazí).

Obr. 13: Ukázka elektroforézy vzorků DNA syntetizované při qPCR.

5. Diskuze

Téma bakalářské práce navazuje na dosavadní studie věnující se benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I a jejich působení na expresi biotransformačních enzymů. V rámci projektu zabývajícím se vlivem zvýšené exprese a aktivity CYP1A1 na genotoxicitu benzo[*a*]pyrenu *in vivo* bylo cílem předkládané bakalářské práce charakterizovat případné rozdíly v expresi CYP1A1 a CYP1A2 na úrovni mRNA v orgánech laboratorních potkanů vystavených buď benzo[*a*]pyrenu nebo Sudanu I samostatně nebo oběma látkám v různém sledu podání.

Ke zjištění výsledků byla použita metoda kvantitativní PCR, pomocí které byla kvantifikována mRNA pro CYP1A1 a CYP1A2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů premedikovaných BaP, Sudanem I a jejich kombinacemi. Všechny uvedené premedikace vedly k indukci genové exprese CYP1A1 a CYP1A2 ve všech sledovaných orgánech. Indukce CYP1A1 byla nejvyšší v játrech potkanů, kde se pohybovala v řádech tisíců. Největší indukční potenciál na expresi genu CYP1A1 mělo kombinované podání BaP+SI, které v játrech a ledvinách laboratorních potkanů způsobilo aditivní navýšení indukce v porovnání se samostatným podáním buď BaP nebo Sudanu I. Aplikace BaP před Sudanem I vedla také k více jak čtyřnásobnému nárůstu indukce genové exprese CYP1A2 v porovnání s indukčním vlivem samostatného podání jednotlivých látek.

Vystavení lidského organismu znečištěnému ovzduší, cigaretovému kouři a špatným stravovacím návykům patří mezi hlavní příčiny vzniku rakoviny u lidí. Jedním z důvodů vzniku nádorového bujení je tvorba aduktů chemických karcinogenů s DNA, která je podmíněná jejich metabolickou aktivací [56]. Mezi takové látky patří i benzo[*a*]pyren a jiné polycyklické aromatické uhlovodíky a i Sudan I.

Významnou roli v biotransformaci obou studovaných látek hraje cytochrom P450 1A1. Přeměna Sudanu I CYP1A1 vede jak u laboratorních potkanů tak u lidí k jeho bioaktivaci ve směru tvorby aduktů s DNA. Sudan I působí navíc jako významný induktor exprese CYP1A na úrovni jak mRNA tak proteinů v játrech, ledvinách a plicích potkanů. Tato indukce má za následek zvýšení aktivity CYP1A [41]. Svým indukčním vlivem na CYP1A tak může Sudan I významně ovlivňovat svůj vlastní genotoxický potenciál.

Stejným způsobem zasahuje do svého metabolismu i BaP, u kterého byl také prokázán vliv na nárůst exprese CYP1A. Dosud ovšem není úplně prokázána výsledná role CYP1A1 v biotransformaci BaP. Studie prováděné *in vitro* ukazují, že se CYP1A1 podílí na metabolické aktivaci BaP, která vede v několika krocích přes epoxid a dihydrodiol k tvorbě reaktivních derivátů BaP schopných reagovat s DNA [57]. Výsledky z experimentů prováděných *in vivo* na myších s deletovaným genem *CYP1A1* nebo myších s deletovaným genem pro NADPH:cytochrom P450 reduktasu oproti tomu ukazují spíše na detoxikační vliv CYP1A1 při přeměně BaP [56].

BaP a Sudan I jsou schopny vázat se na Ah receptor a aktivovat ho, což vede ke zvýšení exprese CYP1A, které jsou pomocí tohoto receptoru regulovány. K indukci CYP1A vystavením organismu účinku polycyklických aromatických uhlovodíků dochází nejvíce v játrech, ledvinách a plicích [58]. Výsledky bakalářské práce potvrzují indukční vliv BaP a Sudanu I na genovou expresi CYP1A1 a CYP1A2, který pravděpodobně vede i ke zvýšení exprese na úrovni proteinu.

Cytochromy P450 1A mohou přeměňovat širokou řadu substrátů s karcinogenními vlastnostmi a indukce těchto enzymů jedním substrátem může zvýšit aktivaci jiného xenobiotika. Důsledkem toho mohou být neočekávané interakce cizorodých látek [9]. Kombinované podání obou

látek laboratorním potkanům vedlo v případě podání BaP před Sudanem I k aditivnímu nárůstu indukce CYP1A1 v játrech a ledvinách a CYP1A2 v plicích. Ukazuje se tedy, že vystavení organismu oběma látkám najednou může vést k ještě většímu vzájemnému ovlivnění jejich genotoxického potenciálu zvýšenou expresí biotransformačních enzymů podílejících se na jejich aktivaci či detoxikaci.

6. Závěr

V rámci této bakalářské práce byla úspěšně izolována celková RNA z jater, ledvin a plic laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi, která byla dále převedena na cDNA reverzní transkripcí s použitím náhodných hexamerů jako primerů. Relativní zastoupení mRNA bylo kvantifikováno metodou kvantitativní PCR pro CYP1A1 a 1A2 a porovnáno s kontrolním genem β -aktinem. Byla zjištěna zvýšená indukce exprese CYP1A1 a 1A2 pro jednotlivé orgány při podání benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I. Dále se podařilo prokázat aditivní efekt obou látek na indukci CYP1A1 u jater a ledvin a na indukci CYP1A2 u plicních vzorků.

Seznam literatury:

- [1] Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace [online], [cit. 3.6.2015], Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>
- [2] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Jr., Martínek, V., Páca, J.: Chem. Listy 98, 876 – 890 (2004)
- [3] Moserová M.: Disertační práce, PřF UK, Praha (2011)
- [4] Sudan I, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Some aromatic azo compounds, Vol. 8, Lyon, France, str. 225 – 232 (1975)
- [5] Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: Chem. Listy 94, 913 – 914 (2000).
- [6] Parkinson, A., Ogilvie, B. W.: Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 2nd ed., 133 – 224 (2010)
- [7] Guengerich, F. P.: Cytochrome P450, Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics, 1st ed., Chichester: John Wiley Sons (2001)
- [8] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Chem. Listy 93, 229 – 237 (1999).
- [9] Ma, Q., Lu, A. Y. H.: Drug Metab. Dispos. 35, 1009 – 1016 (2007).
- [10] Nelson, D. R.: Arch. Biochem. Biophys. 369, 1 – 10 (2009)
- [11] Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2379 (1964)
- [12] Nelson, D. R.: Methods Mol. Biol. 320, 1 – 10 (2006)

- [13] Hu, B., Sun, C., Xu, S., Zhou, W.: On Biomimetics 8, 163 – 195 (2011)
- [14] Yin, H. C., Tseng, H. P., Chung, H. Y., Ko, C. Y., Tzou, W. S.: Toxicol. Sci. 103(1), 158–168 (2008)
- [15] Lewis, D. F. V., Lake B. G., George, S. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., Beresford, A. P., Goldfarb, P. S., Guengerich, F. P.: Toxicology 139, 53–79 (1999)
- [16] Walsh, A. A., Szklarz, G. D., Scott, E. E.: J. Biol. Chem. 288(18), 12932–43 (2013)
- [17] Mercurio, M. G., Shiff, S. J., Gaibraith, R. A., Sassa, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 210, 350–355 (1995)
- [18] Fan-dong, Meng, Ping, Ma, Cheng-guang, Sui, Xin, Tian, You-hong Jiang: Sci. Rep. 5, 1–6 (2015)
- [19] Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., Roots, I.: Br. J. Clin. Pharmacol. 47, 445–449 (1999)
- [20] Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G., Rahmani, R.: Toxicology. 153(1-3), 73–82 (2000)
- [21] Noakes, R.: Int. J. Tryptophan Res. 8, 7–18 (2015)
- [22] Burbach, K. M., Poland, A., Bradfield, C. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(17), 8185–8189 (1992)
- [23] Tian, Y., Ke, S., Denison, M. S., Rabson, A. B., Gallo, M. A.: J. Biol. Chem. 274(1), 510–515 (1999)
- [24] Nebert, D. W., Karp, C. L.: J. Biol. Chem. 283(52), 36061–5 (2008)
- [25] Safe, S.: Toxicol. Lett. 120(1-3), 1–7 (2001)
- [26] Jones, S.: Genome Biol. 5(6), 226 (2004)

- [27] Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y., Fujii-Kuriyama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184(1), 246–253 (1992)
- [28] Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 86(1), 40–53 (2010)
- [29] Denison, M. S., Nagy S., R.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334 (2003)
- [30] Kumar, M. B., Ramadoss, P., Reen, R. K., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H.: *J. Biol. Chem.* 276(45), 42302–10 (2001)
- [31] Taylor, B. L., Zhulin, I. B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 479–506 (1999)
- [32] Pollenz, R. S., Barbour, E. R.: *Mol. Cell. Biol.* 20(16), 6095–104 (2000)
- [33] Perdew, G. H.: *Toxicol. Sci.* 106(2), 301–303 (2008)
- [34] Barouki, R., Coumoul, X., Fernandez-Salguero, P. M.: *FEBS Lett.* 581(19), 3608–15 (2007)
- [35] Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., Spandidos, D. A.: *BMC Cancer* 9, 187 (2009)
- [36] Tomaniová, M., Kocourek, V., Hajšlová, J.: *Chem. Listy* 91, 357–366 (1997).
- [37] Aimová, D., Poljaková, J., Kotrbová, V., Moserová, M., Frei, E., Arlt, V. M., Stiborová, M.: *Interdiscip. Toxicol.* 1(2), 160–168 (2008)
- [38] Benzo[*a*]pyrene, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk, Vol. 100F, Lyon, France, str. 111–144 (2012).
- [39] Zhao, W., Wu, M., Lai, Y., Deng, W., Liu, Y., Zhang, Z.: *Toxicology* 309, 73–80 (2013)

- [40] Barhoumi, R., Mouneimne, Y., Ramos, E., Morisseau, C., Hammock, B. D., Safe, S., Parrish, A. R., Burghardt, R. C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253(1), 45–56 (2011)
- [41] Stiborová, M., Moserová, M., Černá, V., Indra, R., Dračínský, M., Šulc, M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H., Frei, E., Arlt, V. M.: *Toxicology* 318, 1–12 (2014)
- [42] Burczynski, M. E., Penning, T. M.: *Cancer Res.* 60(4), 908–915 (2000)
- [43] Chung, K. T., Stevens S. E., Jr.: *Environ. Toxicol. Chem.* 12(11), 2121–32 (1993)
- [44] Zdroj: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sudan_I-gelb.png [online], [cit. 3.7.2015]
- [45] *The EFSA Journal* 263, 19–23 (2005)
- [46] Stiborová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., Milichovský, J., Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, H. H., Frei, E.: *Chem. Res. Toxicol.* 26(2), 290–299 (2013)
- [47] Stiborová, M., Martínek, V., Semanská, M., Hodek, P., Dračínský, M., Cvačka, J., Schmeiser, H. H., Frei E.: *Interdiscip. Toxicol.* 2(3), 195–200 (2009)
- [48] Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: *Cancer Res.* 62(20), 5678–84 (2002)
- [49] Peirson, S. N., Butler, J. N.: *Methods Mol. Biol.* 362, 315–316 (2007).
- [50] Genaid: [online], [cit. 15.4.2015], Dostupné z: <http://www.geneaid.com/sites/default/files/GZR5.pdf>
- [51] Lab Guide, Průvodce Laboratoří: Syntéza cDNA, [online], [cit. 18.4.2015] Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>

- [52] Svobodová, D.: Bakalářská práce, PřF MU, Brno (2006)
- [53] Kubista, M., Andrade, J., M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N.: *Mol. Aspects Med.* 27, 2–3 (2006)
- [54] Wong, M. L., Medrano, J. F.: *Bio- Techniques* 39, 75–85 (2005)
- [55] Life Technologies: TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol, [online], [cit. 20.4.2015] Dostupné z:
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf
- [56] Arlt, V. M., Poirier, M. C., Sykes, S. E., John, K., Moserová, M., Stiborová, M., Wolf, C. R., Henderson, C. J., Phillips, D. H.: *Toxicol. Lett.* 213(2), 160–166 (2012)
- [57] Arlt, V. M., Stiborová, M., Henderson, C. J., Thiemann, M., Frei, E., Aimová, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Schmitz, O. J., Farmer, P. B., Wolf, C. R., Phillips D. H.: *Carcinogenesis* 29(3), 656–665 (2008)
- [58] Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., Gonzalez, F., J.: *J. Biol. Chem.* 279(23), 23847–50 (2004)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámky